NAOSITE: Nagasaki University's Academic Output SITE

Title	魚類を用いた内分泌かく乱化学物質評価法に関する研究
Author(s)	石橋, 弘志
Citation	(2003-03-31)
Issue Date	2003-03-31
URL	http://hdl.handle.net/10069/7316
Right	

This document is downloaded at: 2015-11-06T09:40:54Z

http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp

第５章　キンギョ血中ビテロゲニン及びステロイドホルモン合成、肝チトクロームP450 1A及びグルタチオン-*S*-トランスフェラーゼ活性に及ぼすノニルフェノールと植物エストロゲン高含量飼料の影響

５．１　研究目的

内分泌かく乱化学物質が、野生生物やヒトの内分泌及び生殖系などに深刻な影響を及ぼす可能性が示唆されている[1-3]。これらの物質は最終的に水環境中に放出されることから、淡水や海産魚類の生殖機能に対し不可逆的作用を引き起こす可能性が考えられる。これまで魚類において、主にエストラジール-17βや 11-ケトテストステロンなどステロイドホルモンの解析が生物学的影響評価手法として用いられてきた。しかしながらこれらの解析に加え、近年、内分泌かく乱化学物質の新規スクリーニング法の開発が国際的に行われており[4,5]、雌特異タンパク質、ビテロゲニンは魚類や他の卵生脊椎動物におけるエストロゲン様物質曝露の有用な指標と考えられている。ビテロゲニンは卵生脊椎動物における卵黄前駆タンパク質であり、硬骨魚類においては生殖腺から分泌されたエストロゲンの作用により肝臓中で合成され、血中を介して生殖腺に取り込まれ、卵母細胞の発達に重要な役割を果たしている。高濃度の血中ビテロゲニン合成は主に成熟した雌魚に観察されるが、通常、雄魚及び性的に未成熟な魚類においてビテロゲニンは検出されない。しかしながら、アルキルフェノール類や合成エストロゲンなどエストロゲン様作用を示す物質は、雄あるいは未成熟魚においてビテロゲニンを合成することから、ビテロゲニンは水環境中のエストロゲン様物質の存在を検出するための有用な指標となる[6]。

ノニルフェノール（NP）は、プロピレンの3重合体のノネンとフェノールの反応により工業的に合成される。NP はエチレンオキサイドと反応させノニルフェノールエトキシレート（NPEO）の形で非イオン界面活性剤として用いられる。日本では NPEO は主に工業用の洗浄剤、分散剤として繊維工業、製紙工業、金属工業、農薬工業等に使用されている。NPEO はアルキルフェノールエトキシレート（APEO）の一種であり、APEO のアルキル基の中でも炭素数 9 の NPEO の生産量は約 80 %と最も多く、残りの大部分は炭素数 8 のオクチルフェノールエトキシレートである。NPEO は下水処理場の好気性汚泥処理等によりエトキシ基の短縮が起こりノニルフェノールジエトキシレート（NP2EO）やノニルフェノールモノエトキシレート（NP1EO）、エトキシ基の末端がカルボキシル化したノニルフェノールジカルボキシレート（NP2EC）、ノニルフェノールモノカルボキシレート（NP1EC）といった中間体が生成し、その後、嫌気性汚泥処理を経て NP を生成することが報告されている [7]。NP の異性体である 4-ノニルフェノールは、17.7 μg/l 以下の曝露濃度において、メダカ *Oryzias latipes* の性分化異常や受精率低下を引き起こし [8]、50 μg/l 以上の曝露濃度において、雄メダカに精卵巣を形成されるという報告がある [9]。このように、魚類に対する内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用や、それらの作用によって引き起こされる生態影響評価を行うために、*in vitro* においてエストロゲン受容体結合試験や酵母 two-hybrid 法によるエストロゲン活性試験などが行われている。*In vivo* においては、ビテロゲニン産生試験、一世代試験、多世代試験などが実施され始めている。しかしながら、これらスクリーニング及び試験系において、魚類を飼育するために用いられる市販飼料に含まれるエストロゲン様

物質、特に植物エストロゲンと試験化学物質の複合作用についてはほとんど知見がない。

本論文の第３，４章において、市販飼料中には植物エストロゲンが含まれており、それらが雄キンギョの血中ビテロゲニンを産生することを明らかにした。大豆成分やそれらに含まれるゲニステイン、ダイゼイン、クメステロール及びイクオールなどエストロゲン様作用を示す植物エストロゲンは、哺乳類において生殖機能を撹乱することが示されている [10,11]。多くの植物エストロゲンは標的組織においてエストロゲン受容体に結合し、RNA 合成においてエストロゲン・アゴニスト作用として働き [12,13]、あるいは多くの RNA 応答を阻害しエストロゲン・アンタゴニスト作用を示し、結果として抗エストロゲン的な生理的影響を及ぼす [14]。一般に、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用を調べるスクリーニング試験においては、魚種に応じた様々な市販飼料が用いられている。それら飼料中に含まれる植物エストロゲンは、エストロゲン受容体に結合しエストロゲン様作用を示すことから評価する試験化学物質と相互作用し、結果として、それら試験化学物質のエストロゲン様作用に影響を与え、さらには複合作用を及ぼす可能性も考えられる。

本研究では、キンギョ *Carassius auratus* を用い、飼料中に含まれる植物エストロゲンと NP の複合影響を明らかにすることを目的に、ゲニステインやダイゼインなど植物エストロゲン低含有（FD2）あるいは高含有飼料（CD2）を与え、各濃度の NP に曝露した雄キンギョにおける血中ビテロゲニン産生、ステロイドホルモン（テストステロン、11-ケトテストステロン及びエストラジオール-17β）合成、肝チトクローム P450 1A（CYP 1A）依存性酵素活性及びグルタ

チオン-*S*-トランスフェラーゼ（GST）活性に及ぼす影響を評価した。

５．２　材料と方法

５．２．１　化学物質と魚類飼育用飼料

NP はアルドリッチ（東京）、E2 はシグマ（東京）より購入した。これら試験化学物質はジメチルスルフォキシド（DMSO）に溶解し実験に供した。魚類飼育用飼料は、大豆及び魚粉不使用のカゼイン主原料の試作飼料 No.5（FD2）、マス用飼料（TD2）及び観賞用コイ用飼料（CD2）を用いた[15]。TD2 及び CD2 はそれぞれ大洋飼料株式会社（知多）製のマスクランブル餌とコイ用浮き餌 EP 1.5 を用いた。各飼料の主原料及び成分を Table 1 に示す。

５．２．２　魚類飼育用飼料の植物エストロゲン含量とエストロゲン活性

FD2、TD2 及び CD2 中の植物エストロゲン含量は、第３章の方法に従い、液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）によって測定した。また、それら飼料中の総エストロゲン活性は、第４章の方法に従い、two-hybrid 法によりヒトエストロゲン受容体アルファ及びベータ（hER-α及びβ）がそれぞれ組み込まれた酵母を用い測定した。

５．２．３　供試魚と曝露実験

５．２．３．１　各種飼料による雄キンギョの血中ビテロゲニン産生

性成熟した雄キンギョ *Carassius auratus* を養殖業者より購入して実験に供した。購入した実験魚は室内の水槽において、自然状態下の水温及び光周期で維持した。30 l 容のガラス製水槽に各 6 個体ずつ、3 群に分け 63 日間飼育した（2001 年 3 月～5 月）。飼育水は脱塩した水道水を使用した。FD2、TD2 及び CD2 を

毎日体重あたり 1.0 %量与えた。水換えは 1 週間に 1 回行い、投与開始から 1 週間毎に標準体重及び標準体長を測定した。給餌前と給餌 7、14、28、42、63 日後に経時的に採血を行った。63 日間の給餌終了後、各個体の標準体重及び標準体長を測定し、血液、生殖腺及び肝膵臓を摘出した。摘出した生殖腺及び肝膵臓は重量を測定後、分析まで-80℃で保存した。また、それぞれ標準体重に対する割合を生殖腺体指数 (GSI, %) 及び肝臓体指数 (HSI, %) として算出した。

５．２．３．２　各種飼料を与えた雄キンギョへの NP 曝露

性成熟した雄キンギョを養殖業者より購入して実験に供した。購入した実験魚は室内の水槽において、自然状態下の水温及び光周期で維持した。60 個体の試験魚（体重：18.5-46.6g）をそれぞれ 12 群に分け、脱塩素水道水で初期設定濃度 0.1, 1, 10 及び 100 μg/l に調製した NP に、それぞれ水温 21±1°C で 28 日間曝露した（2001 年 5 月～6 月）。対照群には DMSO（0.01 ml/l）のみを、陽性対照群には初期設定濃度 1 μg/l の E2 を同様の条件で曝露した。曝露は各群 25 l のガラス製水槽を用い、光周期は 12 時間明期、12 時間暗期、pH 7.2-7.6 で行った。水槽内の NP 曝露溶液は 24 時間毎に全量交換した。試験魚には体重あたり 1.0 %量の FD2 あるいは CD2 を 1 日 1 回 28 日間毎日与えた。NP 曝露前と曝露 7, 21 及び 28 日後に、各曝露群 5 個体の試験魚より経時的に採血を行った。

28 日間の曝露終了後、各個体の標準体重及び標準体長を測定し、血液、生殖腺及び肝膵臓を摘出した。摘出した生殖腺及び肝膵臓は重量を測定後、分析まで-80℃で保存した。また、それぞれ標準体重に対する割合を生殖腺体指数 (GSI, %) 及び肝臓体指数 (HSI, %) として算出した。

５．２．４　血液とミクロソーム試料

血液は魚の尾部動静脈より 25 G の注射針を用いて採取した。血液は直ちに 0.1 容量の aprotinin（10,000 KIU/ml）、0.1% phenylmethylsufonyl fluoride 及び heparin（14.0 U/ml）を含む生理食塩水溶液と混合した。混合液は 4℃で 20 分間（1,800 ×g）遠心して血漿に分離した。血漿は、1.5 ml 容チューブに分注し、速やかに凍結し使用するまで –30℃で保存した。全ての操作は 4℃で行った。

摘出した肝膵臓は、4 倍量の 0.25 M スクロース中でホモジナイズし、ミクロソーム画分は Arizono ら [16]、Ariyoshi ら [17]の方法に従って調製した。総タンパク量は Lowry ら [18]の方法に従い、牛血清アルブミンを標準物質として測定した。

Table 1. Ingredients and compositions of fish diets[15)]

Fish diets	Ingredients
Formulated diet (FD2) "No.5"	defatted rice bran 55 %, casein 40 %, vitamin mix, 3.0 %, mineral mix 2.0 %
Trout diet (TD2) "Crumble for trout"	fish meal 65 %, wheat flour 21 %, defatted rice bran 6.0 %, soy bean meal 2.0 %, corn gluten meal 3.0 %, vitamin mix 2.0 %, mineral mix 1.0 %
Carp diet (CD2) "Floating pellet for carp, 1.5"	fish meal 38 %, wheat flour 25 %, defatted rice bran 18 %, soy bean meal 15 %, corn gluten meal 1.0 %, vitamin mix 1.0 %, mineral mix 2.0 %

* Composition which does not include vitamin mix and mineral mix.

５．２．５　血中ビテロゲニン測定

血中ビテロゲニン濃度の測定は、第２章の方法に従って、キンギョビテロゲニンに交差反応性を示す抗コイリポビテリンマウスモノクローナル抗体（トランスジェニック、熊本）を用いた酵素免疫測定法（ELISA）で行った。本測定系では96穴マイクロプレートを用いた。キンギョビテロゲニンは100 μg/l のE2に28日間曝露した雄キンギョ血漿から、陰イオン交換カラムを用いた液体高速クロマトグラフィー (HPLC) により精製した[19]。精製したビテロゲニンのタンパク量は牛血清アルブミンを標準物質してBradford[20]の方法により測定した。標準物質は1穴あたり0.78 ngから50 ngの精製キンギョビテロゲニンを用い、希釈した測定試料のビテロゲニンは二重測定で行った。測定試料の血中ビテロゲニン濃度は、精製ビテロゲニン標準物質の検量線から算出した。本測定系における血中ビテロゲニンの検出限界は39 ng/mlであった。

５．２．６　血中性ステロイドホルモンの測定

血中のエストラジオール-17β (E2)、テストステロン (TS) および11-ケトテストステロン (11-KT) 濃度の測定は、Asahinaら[21]の方法に従い第二抗体固相化法を用いたELISAにより行った。以下にその概要を示した。

HRP標識抗原 (E2: 6-oxo-E2-6-CMO-HRP、TS: Testosterone-3-CMO-HRP、11-KT: 11-oxo-testosterone-3-CMO-HRP)、抗体（E2: anti-6-oxo-E2-6-CMO-BSA、TS: anti-Testosterone-3-CMO-BSA、11-KT: anti-11-oxo-testosterone-3-CMO-BSA）は全てCosmo Bio Co., Ltd.より購入した。o-フェニレンジアミン二塩酸塩（OPD錠）は和光純薬工業（株）より購入した。測定に供した各抗体は、目的とするホル

モンとほぼ特異的に結合し、それ以外のステロイドとの非特異的結合は無視できるほど低かった。また標識抗原の希釈倍率を、E2: 25,000 倍、TS: 25,000 倍、11-KT: 100,000 倍、抗体の希釈倍率を、E2: 25,000 倍、TS: 50,000 倍、11-KT: 50,000 倍とし、それぞれホウ酸緩衝液で希釈した。

保存していた血漿を溶解後、シリコンコーティング済みの試験管に分取した。これに 10 倍量のジエチルエーテルを加えよく撹拌した後、水層とエーテル層が完全に分離するまで数分間静置した。これを冷却器中で-30℃に急冷し、ステロイドホルモンを含むエーテル層を回収した。この抽出操作を 3 回行った後、回収したエーテル層からエーテルを完全に除去し、ホウ酸緩衝液（0.05 M H_3BO_3, 0.5 % 牛血清アルブミン, 0.01 % チメロサール）で再溶解し、測定用試料とした。あらかじめ第二抗体（抗ウサギ IgG ヤギ IgG, # 00779, CAPPEL; U.S.A）を固相化したプレートに、測定用試料、HRP 標識抗原および抗体をそれぞれ 50 µl ずつ順に加え、4℃で 18 時間反応させた。反応終了後、0.85 % NaCl 水溶液で 7 回洗浄し、発色液（0.2 M クエン酸, 0.01 % H_2O_2, 0.05 % OPD）を 150 µl ずつ加え 20℃で 40 分間反応させた。これに 6 N の硫酸を 50 µl ずつ加え反応を停止させた。その後マイクロプレートリーダー（ELx808 Ultra Microplate Reader, BIO-TEK 社製）を用いて 490 nm における吸光値を測定し、総合分析ソフトウェア ASSAY ZAP（BIOSOFT; U.K.）により吸光値からホルモン濃度を算出した。

5．2．7　薬物代謝酵素及び GST 活性測定

CYP1A の活性測定は第 2 章の方法に従い、エトキシレゾルフィン (EROD) 及びメトキシレゾルフィン (MROD) の脱アルカリ化によるレゾルフィン生成を

HPLC で定量することによって行った。62.5 mM リン酸バッファー、6.25 mM $MgCl_2$、0.625 mM NADP+、G-6-P DHase 及び 2.5 μM の各種基質を含む反応液 320 μl にミクロソーム懸濁液 40 μl、5 nM G-6-P 40 μl を添加して 22℃の水浴中で反応を 20 分間行った。反応後、90℃で反応を停止した。反応停止液に 400 μl の精製水を入れて 0.45 μM ポアサイズの PTFT フィルター（ミリポア、ベッドフォード、アメリカ）を通したものを測定用試料とした。測定には蛍光検出器が接続された HPLC を使用した。Waters SYMMETRY C 18 カラムに 0.001 M 酢酸緩衝液 (pH 5.7) /メタノールを 60/40 (1 ml/min) で流し蛍光検出器 (Ex 550 nm, Em 585 nm) によって得られるレゾルフィンのピークを定量した。検量線作製には各濃度に希釈したレゾルフィンを用いた。

GST 活性の測定は、GST・Tag assay kit (ノバゲン、アメリカ) を用い、キットに添付された取扱説明書に従って行った。また、タンパク質の定量は Lowry ら[18]の比色法で行った。

5．2．8　統計解析

全ての統計処理は、Stat View 5.0 for Macintosh を用いて行い、$p<0.05$ を有意差とみなした。標準体長、標準体重、GSI、HSI 及び血中ビテロゲニン濃度は等分散性の検定を行い、等分散性が認められた場合は一元配置分散分析 (one way ANOVA) を行った。一元配置分散分析において、有意差が認められた場合には多重検定 (Dunnett's post-hoc 検定、あるいは Fisher'PLSD post-hoc 検定) により有意差を検定した。等分散性が認められない場合は Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合には Bonferroni adjusement をもって

Mann Whitney の U 検定を行った。また血中ビテロゲニン濃度において、定量下限値以下のデータに関しては定量下限の半数値を用いた。

５．３　結果

５．３．１　飼料中に含まれる植物エストロゲン含量

FD2、TD2 及び CD2 中に含まれるゲニステイン、ダイゼイン、イクオール及びクメステロール含量を Table 2 に示す。CD2 中のゲニステイン（128,358.9 ng/g）は TD2（48,673.2 ng/g）や FD2（57.6 ng/g）と比較して高含量であった。CD2 中のダイゼイン（100,767.8 ng/g）もまた TD2（37,994.7 ng/g）や FD2（69.2 ng/g）と比較して高含量であった。FD2 中のイクオールは 4.0 ng/g 検出されたが、TD2 及び CD2 では検出されなかった。CD2 中のクメステロールは 42.4 ng/g 検出されたのに対し、TD2 は 22.4 ng/g、FD2 は 4.0 ng/g であった。これら 3 種類の飼料における植物エストロゲン含量は CD2>TD2>FD2 の順に高い値を示した。

Table 2. Phytoestrogens contents in fish diets using LS-MS/MS analysis.

Diets	Genistein	Daidzein	Equol	Coumestrol
Formulated diet (FD2)	57.6	69.2	4.0	4.0
Trout diet (TD2)	48,673.2	37,994.7	N.D.	22.4
Carp diet (CD2)	128,358.9	100,767.8	N.D.	42.4

The data of fish diets were represent total ng/g diet. N.D.: Not Detected (less than 4.0 ng/g). Data represents the mean (n=3).

５．３．２　飼料中のエストロゲン活性

各種飼料中のβ-グルクロニダーゼによる酵素処理前後における hER-α及びβに対するエストロゲン活性を Fig. 1 に、それらのエストロゲン活性をエストラジオール-17β量として換算した値（E2 換算値）を Table 3 に示す。β-グルクロニダーゼによる酵素処理前の FD2、TD2 及び CD2 中の hER-αに対するエストロゲン活性は、それぞれ検出限界以下であった（Fig. 1-A)。hER-βに対するエストロゲン活性は、CD2 のみ E2 換算値で 39.91 ng/g 検出され、他の飼料は検出限界以下であった（Fig. 1-C)。

β-グルクロニダーゼによる酵素処理後の FD2、TD2 及び CD2 中の hER-αに対するエストロゲン活性は、それぞれ検出限界以下、26.51 ng/g 及び 95.91 ng/g 検出された（Fig. 1-B)。FD2、TD2 及び CD2 中の hER-βに対するエストロゲン活性は、それぞれ検出限界以下、295.26 ng/g 及び 758.54 ng/g 検出された（Fig. 1-D)。

β-グルクロニダーゼによる酵素処理後における TD2 及び CD2 の hER-βに対するエストロゲン活性は、hER-αに対する活性と比較して 10 倍程度高い活性を示した。これら飼料のエストロゲン活性は CD2>TD2>FD2 の順に高い値を示した。

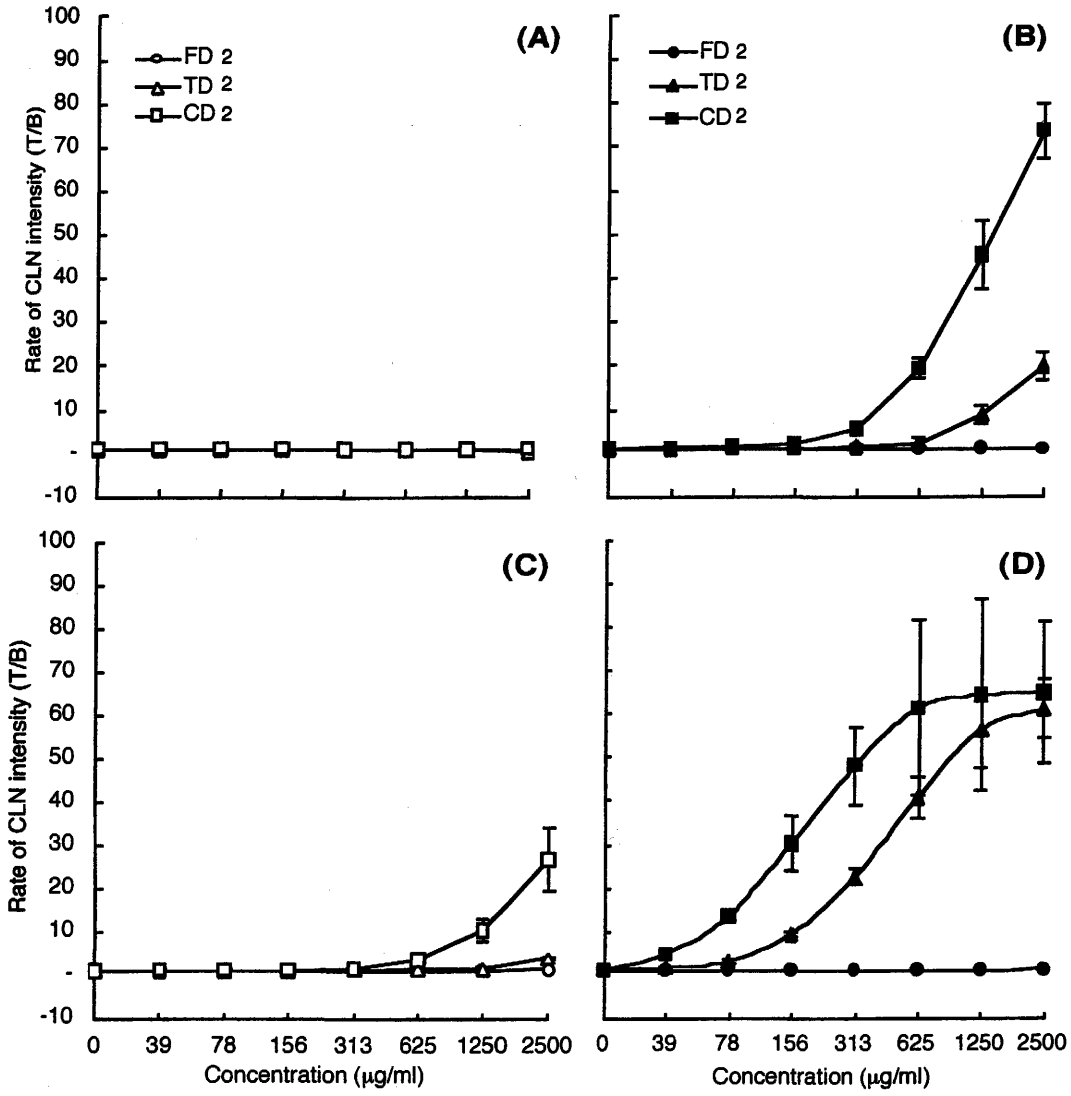

Fig. 1. Dose-response curves of agonist activity for FD2 (○ and ●), TD2 (△ and ▲) and CD2 (□ and ■) using the yeast antagonist assay system for human estrogen receptor α (A and B) and β (C and D). Fish diets with (close circle) or without (open circle) the hydrolysis were showed. The values of antagonist activity were represented as the rate (%) of CLN intensity (T/B). The all data represent the mean (n=4).

Table 3. Estrogenic activities of fish diet for human estrogen receptor-α and β using yeast two-hybrid assay.

Diet	*Estradiol-17β equivalent (ng/g)			
	hER-α		hER-β	
	Without	With	Without	With
Formulated diet (FD2)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Trout diet (TD2)	N.D.	26.51	n.d.	295.26
Carp diet (CD2)	N.D.	95.91	39.91	758.54

*Fifty micrograms of sample was used for the assay. Diets with or without the hydrolysis were also showed. N.D.: Not Detected. n.d.: not determined. The all data represent the mean (n=4).

５．３．３　標準体長、標準体重、GSI、HSI 及び血中ビテロゲニン濃度

雄キンギョに FD2、TD2 及び CD2 を毎日体重あたり 1 %量与え 63 日間飼育したときの標準体重及び標準体長の経時的変化を Fig. 2 に示す。給餌前、給餌 7, 14, 28, 42 及び 63 日後における 3 群間のそれらに有意差は認められなかった（ANOVA）。

雄キンギョに FD2、TD2 及び CD2 を毎日体重あたり 1 %量与え 63 日間飼育した。飼育後における GSI 及び HSI を Fig. 3 に示す。FD2 及び TD2 給餌群の GSI は、それぞれ平均 1.27 %及び 1.21 %であったのに対し、CD2 給餌群は平均 0.97 %と若干低い値を示した（Fig. 3-A）。しかし、これら 3 群間の GSI における有意差は認められなかった（ANOVA）。FD2 給餌群の HSI は、平均 2.38 %であったのに対し、TD2 及び CD2 給餌群は、それぞれ平均 3.39 %及び 3.19 %と若干高い値を示した（Fig. 3-B）。しかし、これら 3 群間の HSI における有意差は認められなかった（ANOVA）。

雄キンギョに FD2、TD2 及び CD2 を毎日体重あたり 1 %量与え 63 日間飼育したときの血中ビテロゲニン濃度の経時的変化を Fig. 4 に示す。CD2 給餌群の血中ビテロゲニン濃度は TD2 給餌群と比較して、給餌 14 及び 28 日後に有意に増加した（$p<0.05$, Mann-Whitney's *U*-test）。CD2 給餌群の血中ビテロゲニン濃度は FD2 給餌群と比較して、給餌 7, 14, 28, 42 及び 63 日後に有意に増加した（$p<0.05$, Mann-Whitney's *U*-test）。これら飼料を与えた雄キンギョの血中ビテロゲニン産生能は CD2>TD2>FD2 の順であった。

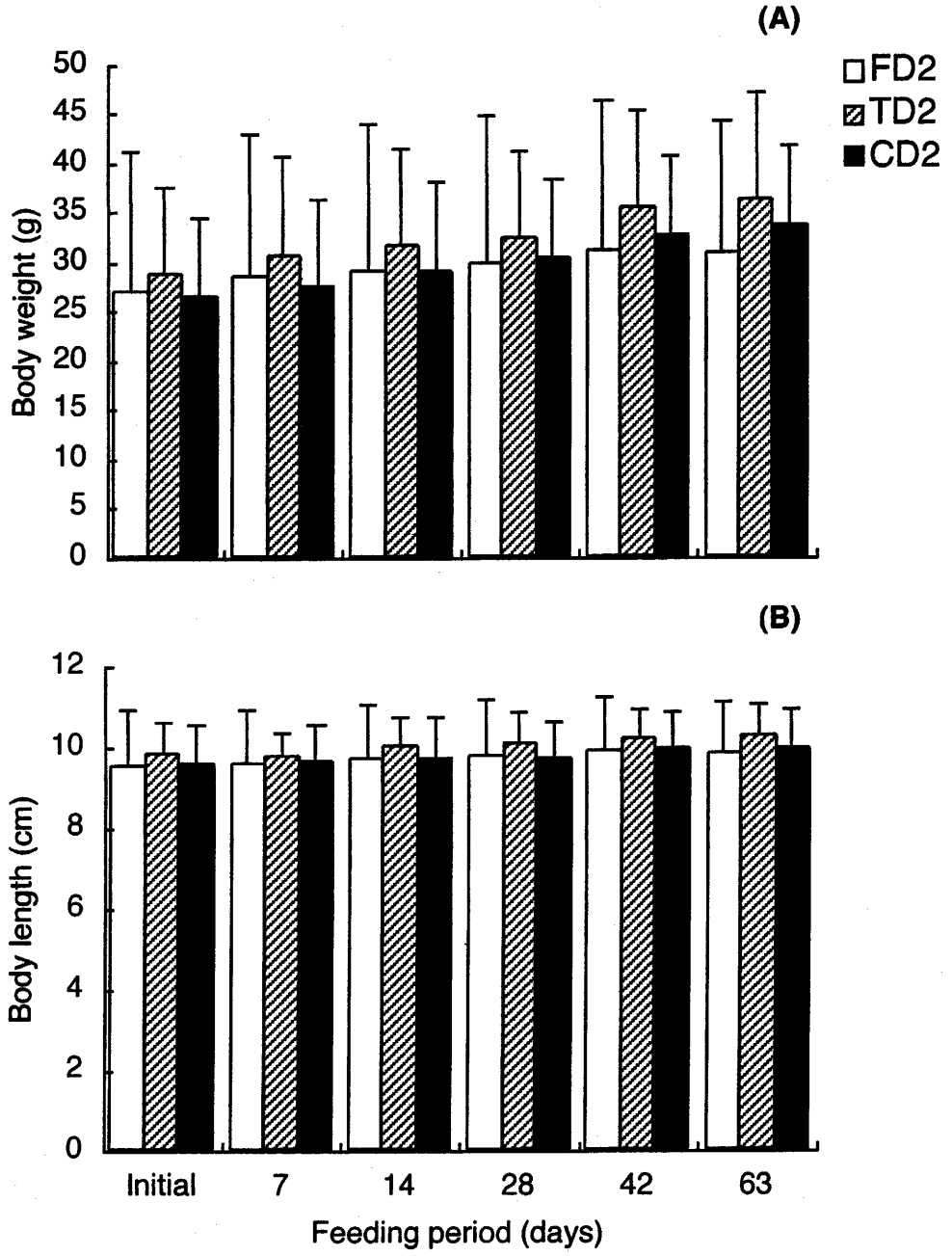

Fig. 2. Change in body weight (A) and body length (B) in the male goldfish fed FD2, TD2, or CD2 for 63 days. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD2, CD2 and FD2) every day for 63 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation.

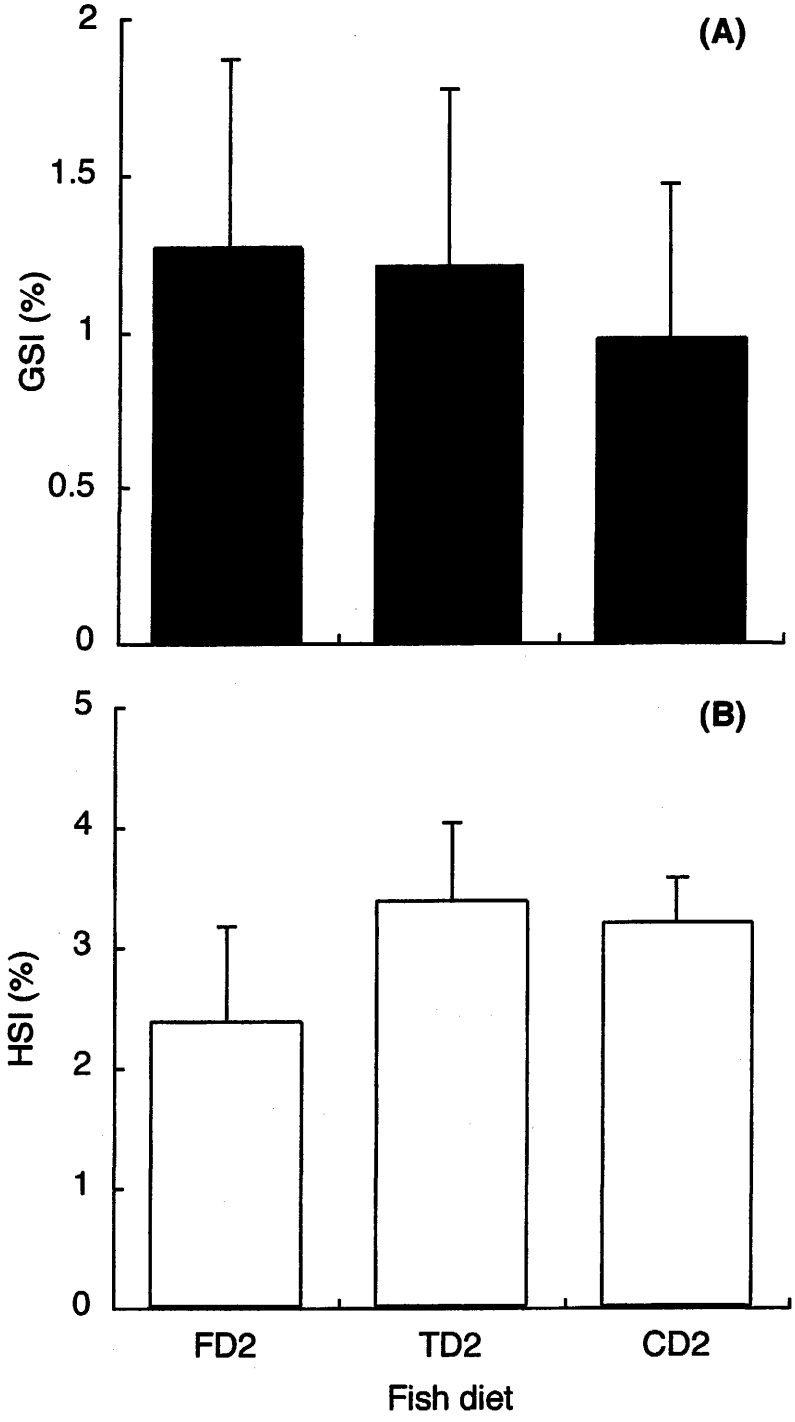

Fig. 3. GSI (A) and HSI (B) in adult male goldfish. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD2, CD2 and FD2) every day for 63 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation.

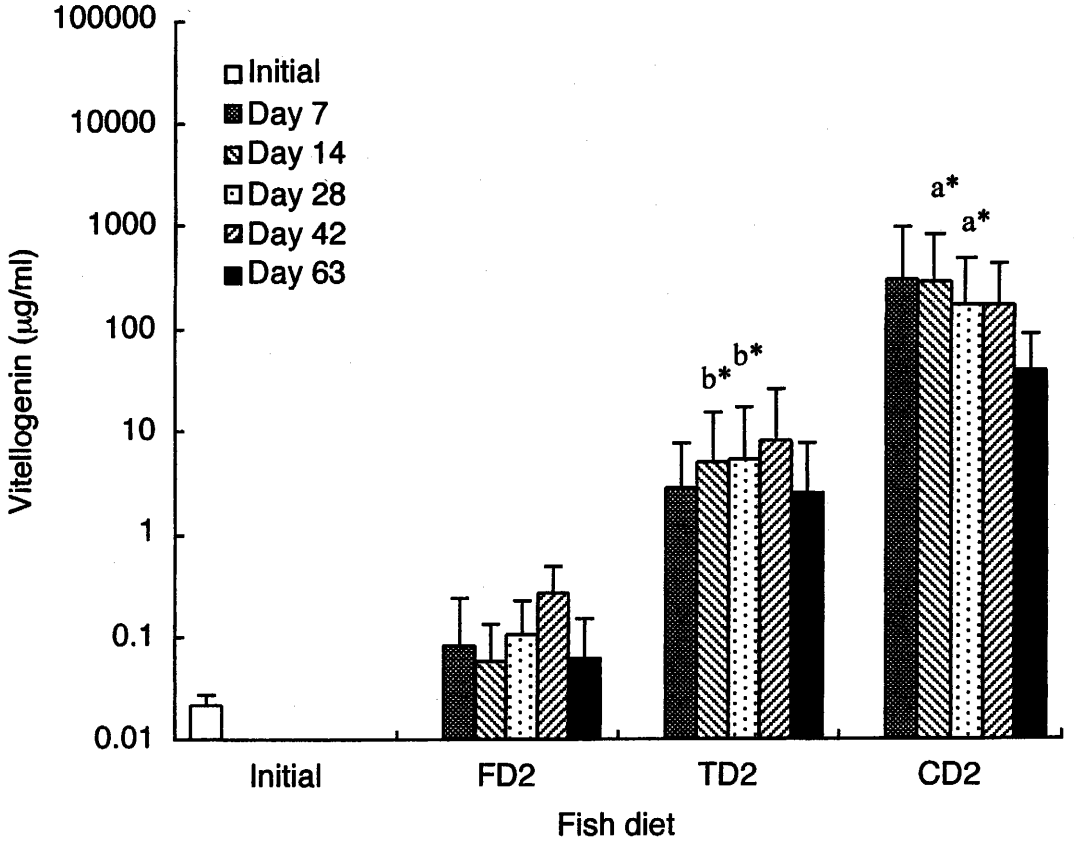

Fig. 4. Plasma vitellogenin levels in adult male goldfish. Fish were fed 1.0 % body weight volume of one of the three diets (TD2, CD2 and FD2) every day for 63 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation. Plasma vitellogenin levels of CD2-fed fish in all feeding period were significant difference compared to that of FD2-fed fish ($p<0.05$, Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney's *U*-test). ^{a*}, Significant difference compared to TD2-fed fish ^{b*} ($p<0.05$, Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney's *U*-test).

５．３．４　標準体長、標準体重、GSI 及び HSI

雄キンギョに FD2 あるいは CD2 を毎日体重あたり 1 %量与え、初期設定濃度 0.1, 1, 10 及び 100 μg/l の NP に 28 日間曝露したときの標準体重及び標準体長を Table 4-1, 4-2, 5-1 及び 5-2 に示す。各曝露群間において有意差は認められなかった（ANOVA）。

FD2 を給餌し NP に 28 日間曝露したときの GSI 及び HSI を Fig. 5-A に示す。FD2 給餌群の HSI は、全曝露群において平均 2～3 %程度で各 NP 曝露群間における有意差は認められなかった（ANOVA）。一方、GSI は、全曝露群において平均 3～4%程度で各 NP 曝露群間における有意差は認められなかった（ANOVA）。

CD2 を給餌し NP に 28 日間曝露したときの GSI 及び HSI を Fig. 5-B に示す。CD2 給餌群の HSI は全曝露群で平均 3～4%程度で各 NP 曝露群間による有意差は認められなかった（ANOVA）。一方、GSI は、各 NP 曝露群間で濃度依存的な変化は認められなかったものの、E2 曝露群のみ対照群と比較して統計学的に有意差が認められた（p<0.05, Dunnett's post-hoc 検定）。

HSI は FD2 給餌群と比較して CD2 給餌群が大きく、GSI は CD2 給餌群と比較して FD2 給餌群が小さい傾向を示した。

Table 4-1. Change in body length in the FD2-fed group exposed to NP concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l for 7, 14, 21, and 28 days

NP treatment (μg/l)	Body length (cm)				
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Initial	9.95±0.71				
Control		10.08±0.47	10.10±0.27	10.20±0.39	10.34±0.38
0.1		10.00±0.32	9.90±0.33	10.14±0.32	10.16±0.29
1.0		9.82±0.78	9.74±0.78	9.92±0.76	10.00±0.76
10		10.02±0.78	9.90±0.87	10.14±0.79	10.12±0.85
100		9.96±0.84	9.86±0.82	10.06±0.79	10.12±0.79
E2-1.0		9.82±1.23	9.74±1.27	9.92±1.19	9.92±1.23

Data represent the mean and standard deviation. The control fish were exposed to the solvent carrier only (DMSO 0.01 ml/l), and the positive control fish were exposed to the nominal concentration of 1.0 μg/l of E2.

Table 4-2. Change in body weight in the FD2-fed group exposed to NP concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l for 7, 14, 21, and 28 days

NP treatment (μg/l)	Body weight (g)				
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Initial	32.3±7.2				
Control		32.0±3.4	32.5±3.1	32.5±3.1	33.9±3.5
0.1		30.1±2.9	30.6±2.4	31.4±2.1	32.2±1.8
1.0		29.9±7.2	30.2±7.4	31.1±7.4	31.7±7.7
10		32.0±7.6	33.1±8.0	33.6±7.7	34.2±7.9
100		31.1±8.7	31.7±8.7	32.3±8.9	33.1±9.2
E2-1.0		31.2±11.9	31.6±11.6	31.8±11.4	32.6±11.7

Data represent the mean and standard deviation. The control fish were exposed to the solvent carrier only (DMSO 0.01 ml/l), and the positive control fish were exposed to the nominal concentration of 1.0 μg/l of E2.

Table 5-1. Change in body length in the CD2-fed group exposed to NP concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l for 7, 14, 21, and 28 days

NP treatment (μg/l)	Body length (cm)				
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Initial	9.50±0.67				
Control		9.80±0.57	9.86±0.64	9.86±0.56	9.94±0.69
0.1		9.64±0.76	9.60±0.63	9.76±0.71	9.76±0.72
1.0		9.68±0.55	9.68±0.72	9.80±0.65	9.68±0.69
10		9.84±1.00	9.96±0.93	10.00±0.92	9.92±0.96
100		9.46±0.54	9.48±0.59	9.52±0.57	9.52±0.58
E2-1.0		9.46±0.78	9.44±0.45	9.42±0.58	9.44±0.48

Data represent the mean and standard deviation. The control fish were exposed to the solvent carrier only (DMSO 0.01 ml/l), and the positive control fish were exposed to the nominal concentration of 1.0 μg/l of E2.

Table 5-2. Change in body weight in the CD2-fed group exposed to NP concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l for 7, 14, 21, and 28 days

NP treatment (μg/l)	Body weight (g)				
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Initial	30.8±5.7				
Control		31.8±5.8	32.7±5.7	33.6±5.6	34.7±6.3
0.1		31.8±6.0	32.8±6.4	33.7±6.6	34.7±7.1
1.0		32.5±5.7	33.6±6.7	34.8±7.8	35.3±7.5
10		32.1±8.1	33.6±7.9	34.6±8.2	35.2±8.5
100		30.0±4.3	30.4±4.2	31.5±4.5	32.4±4.8
E2-1.0		29.9±6.3	29.3±6.6	29.8±6.5	30.5±6.6

Data represent the mean and standard deviation. The control fish were exposed to the solvent carrier only (DMSO 0.01 ml/l), and the positive control fish were exposed to the nominal concentration of 1.0 μg/l of E2.

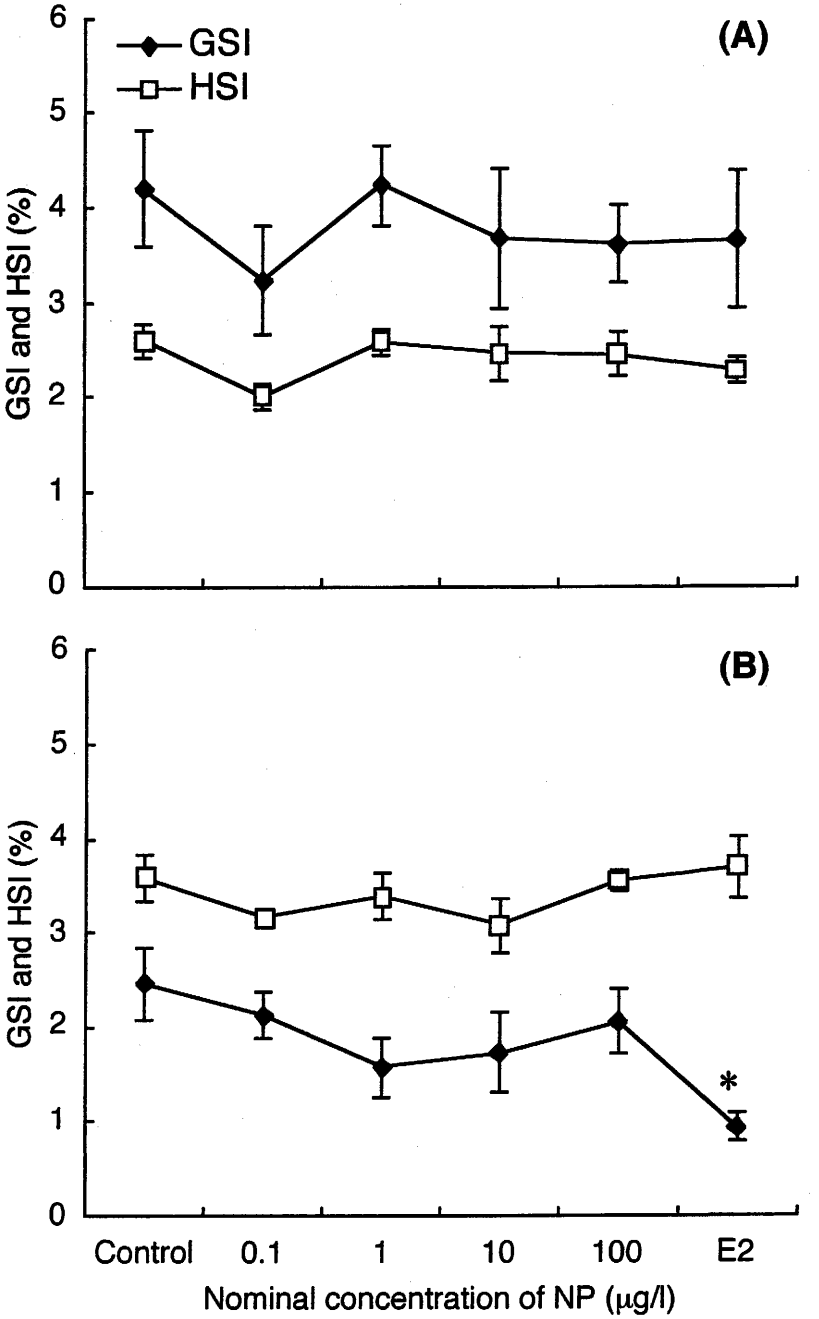

Fig. 5. Levels of gonadosomatic index (GSI, ◆) and hepatosomatic index (HSI, □) in the FD2- (A) or CD2- (B) fed group exposed to the nominal concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l of NP for 28 days. The GSI, % and HSI, % was calculated as a ratio of gonad and hepatopancreas weight to body weight. Columns and bars represent the mean and standard deviation. *, Significant difference compared to the control fish ($p<0.05$, Dunnett's Post-hoc test).

５．３．５　血中ビテロゲニン

雄キンギョにFD2を毎日体重の1 %量与え、初期設定濃度0.1, 1, 10及び100 μg/lのNPに28日間曝露したときの血中ビテロゲニン濃度変化をFig. 6-Aに示す。FD2を給餌した雄キンギョのNP曝露前と曝露7, 21及び28日後における血中ビテロゲニン濃度は、対照群、NP-0.1～10 μg/l曝露群ともに平均10 μg/ml程度であった。FD2を給餌したNP-100 μg/l及びE2-1 μg/l曝露群は、対照群と比較して曝露 7 日後に有意に高い血中ビテロゲニン濃度を示した（p<0.05, Dunnett's post-hoc検定)。また、曝露21及び28日後も同様に有意に高い血中ビテロゲニン濃度を示した（p<0.05, Dunnett's post-hoc検定)。

雄キンギョにCD2を毎日体重の1 %量与え、初期設定濃度0.1, 1, 10及び100 μg/lのNPに28日間曝露したときの血中ビテロゲニン濃度変化をFig. 6-Bに示す。CD2を給餌した対照群及びNP-0.1～100 μg/l曝露群の曝露7日後における血中ビテロゲニン濃度は平均 100 μg/ml 程度であり、対照群と比較して有意差は認められなかった（ANOVA)。しかしながら、NP-100 μg/l 曝露 28 日後においてのみ対照群と比較して有意に高い血中ビテロゲニンの増加が認められた（p<0.05, Dunnett's post-hoc検定)。FD2給餌対照群と比較して、CD2給餌対照群は10～100倍程度高濃度のビテロゲニンを産生した。

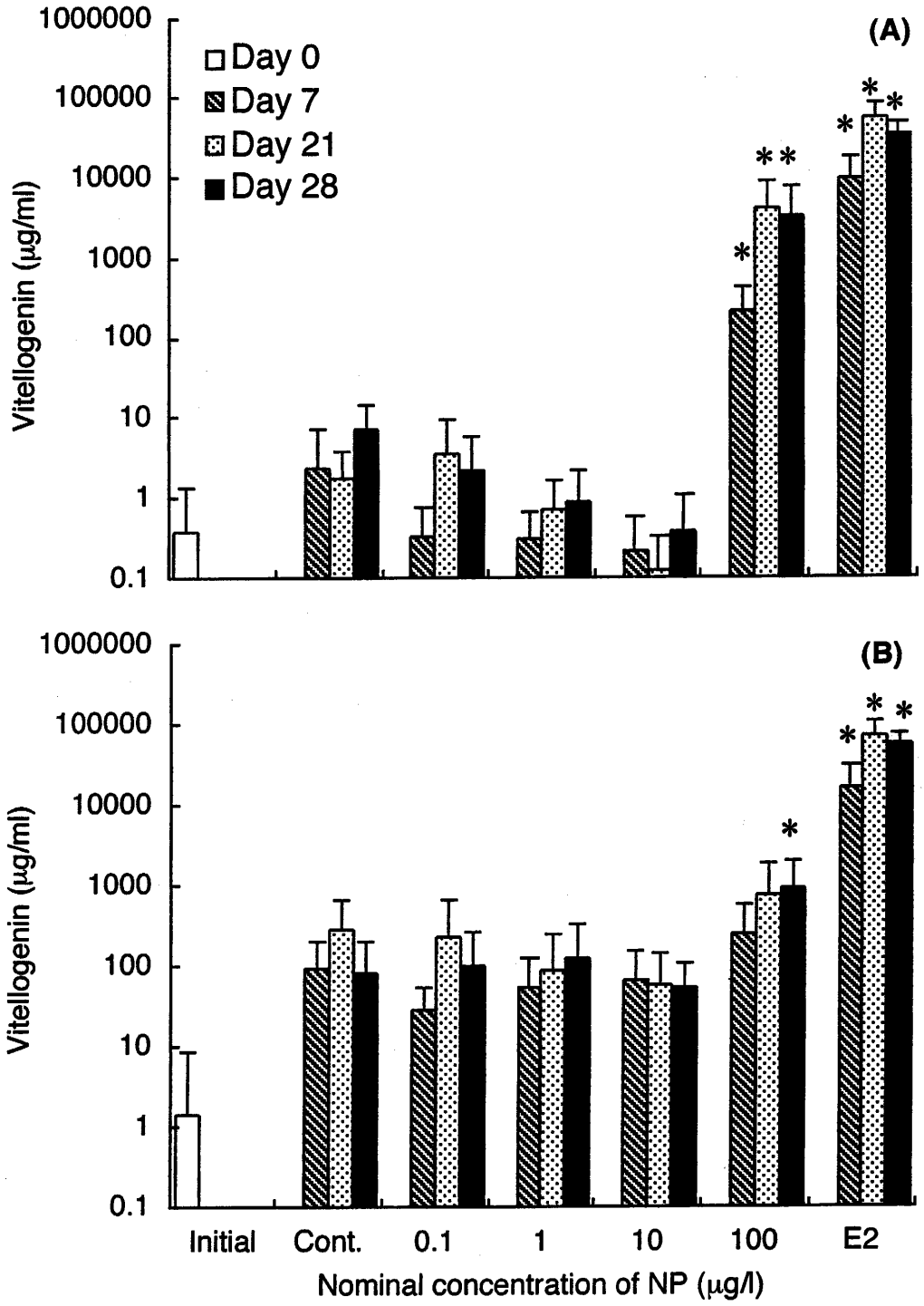

Fig. 6. Levels of plasma vitellogenin synthesis in the FD2- (A) or CD2- (B) fed group exposed to the nominal concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l of NP for 7, 21, and 28 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation. *, Significant difference compared to the control fish ($p<0.05$, Dunnett's Post-hoc test).

５．３．６　血中ステロイドホルモン

雄キンギョにFD2あるいはCD2を毎日体重の1 %量与え、初期設定濃度0.1, 1, 10及び100 μg/lのNPに28日間曝露したときの血中TS, 11-KT及びE2濃度をFig. 7に示す。

FD2を給餌したNP-0.1及び10 μg/l曝露における血中TS濃度は、対照群と比較して有意に低い値を示した（p<0.05, Dunnett's post-hoc検定）。しかし、NP曝露濃度に依存した明瞭な変化は認められず、それら以外の曝露群においては平均10～15 ng/mlの濃度範囲で推移した（Fig. 7-A）。一方、CD2を給餌した全曝露群において、各曝露群間に有意差は認められなかった（ANOVA）。しかしながら、全曝露群のTS濃度は曝露前と比較して有意に低値を示した（p<0.05, Fisher'PLSD Post-hoc検定）。特にNP-100 μg/l曝露群では0.5 ng/ml程度で非常に低い値を示した（Fig. 7-B）。

血中11-KT濃度は、FD2給餌群においてはNP-0.1 μg/l曝露群で若干低濃度を示す傾向がみられたものの有意差はなく（ANOVA）、曝露前と同程度であった（Fig. 7-C）。一方、CD2給餌群においては曝露群間における有意差は認められなかったものの（ANOVA）、対照群、NP-100 μg/l及びE2-1 μg/l曝露群は曝露前と比較して有意に低値を示した（p<0.05, Fisher'PLSD Post-hoc検定）。特にNP-100 μg/l曝露群では平均0.3 ng/mlと非常に低い値を示した（Fig. 7-D）。

血中E2濃度は、FD2あるいはCD2給餌NP曝露群全てにおいて、大きな変化は認められず、平均250～1000 pg/mlほどで推移した（Fig. 7-E and F）。いずれの曝露群も対照群との有意差は認められなかった（ANOVA）。

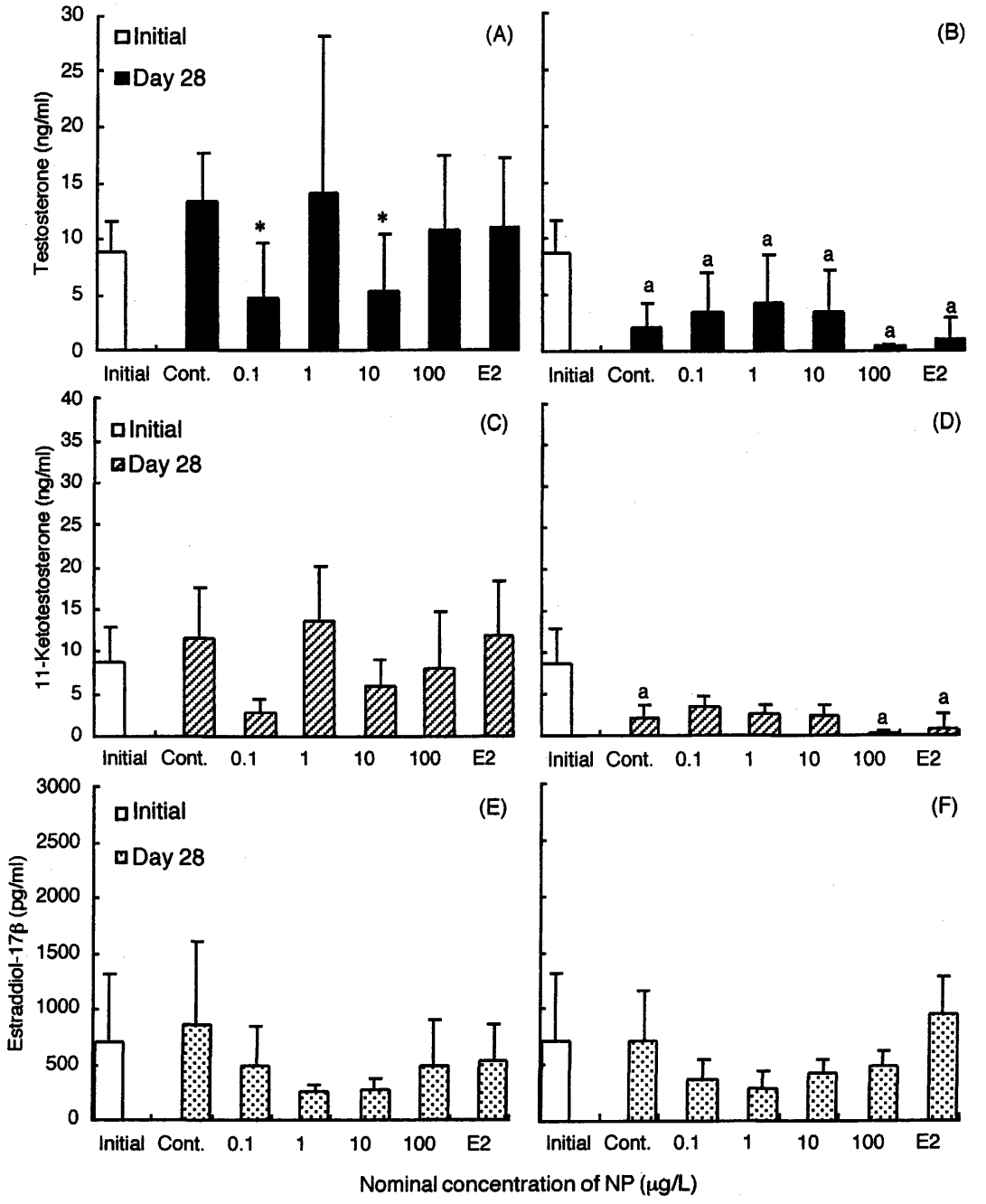

Fig. 7. Levels of plasma testosterone (A and B), 11-ketotestosterone (C and D), and estradiol-17β (E and F) synthesis in the FD2- (left sides) or CD2- (right sides) fed group exposed to the nominal concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l of NP for 28 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation. *, Significant difference compared to the control fish ($p<0.05$, Dunnett's Post-hoc test), and [a], significant difference compared to the initial control fish ($p<0.05$, Fisher'PLSD Post-hoc test).

５．３．７　肝 EROD, MROD 及び GST 活性

FD2 あるいは CD2 を与え NP を 28 日間曝露した雄キンギョの肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性を Fig. 8 に示す。肝ミクロソームおける EROD 及び MROD 活性は、FD 給餌群では各曝露群による有意差はそれぞれ認められず（ANOVA）、平均 0.1 pmol/mg/min 前後であった（Fig. 8-A）。

一方、CD2 給餌群では NP-100 μg/l 曝露群を除いた全曝露群で平均 0.1 pmol/mg/min 前後であった（Fig. 8-B）。NP-100 μg/l 曝露群は対照群と比較して約 3 倍程度高値を示したが、統計学的な有意差は認められなかった（ANOVA）。

FD2 あるいは CD2 を与え NP を 28 日間曝露した雄キンギョにおける肝ミクロソーム中の GST 活性を Fig. 9 に示す。肝ミクロソームおける GST 活性は、FD2 あるいは CD2 を与えた各 NP 曝露群による有意差は認められなかった（ANOVA）。しかし、CD2 給餌群は FD2 給餌群と比較して高い活性を示す傾向にあった。

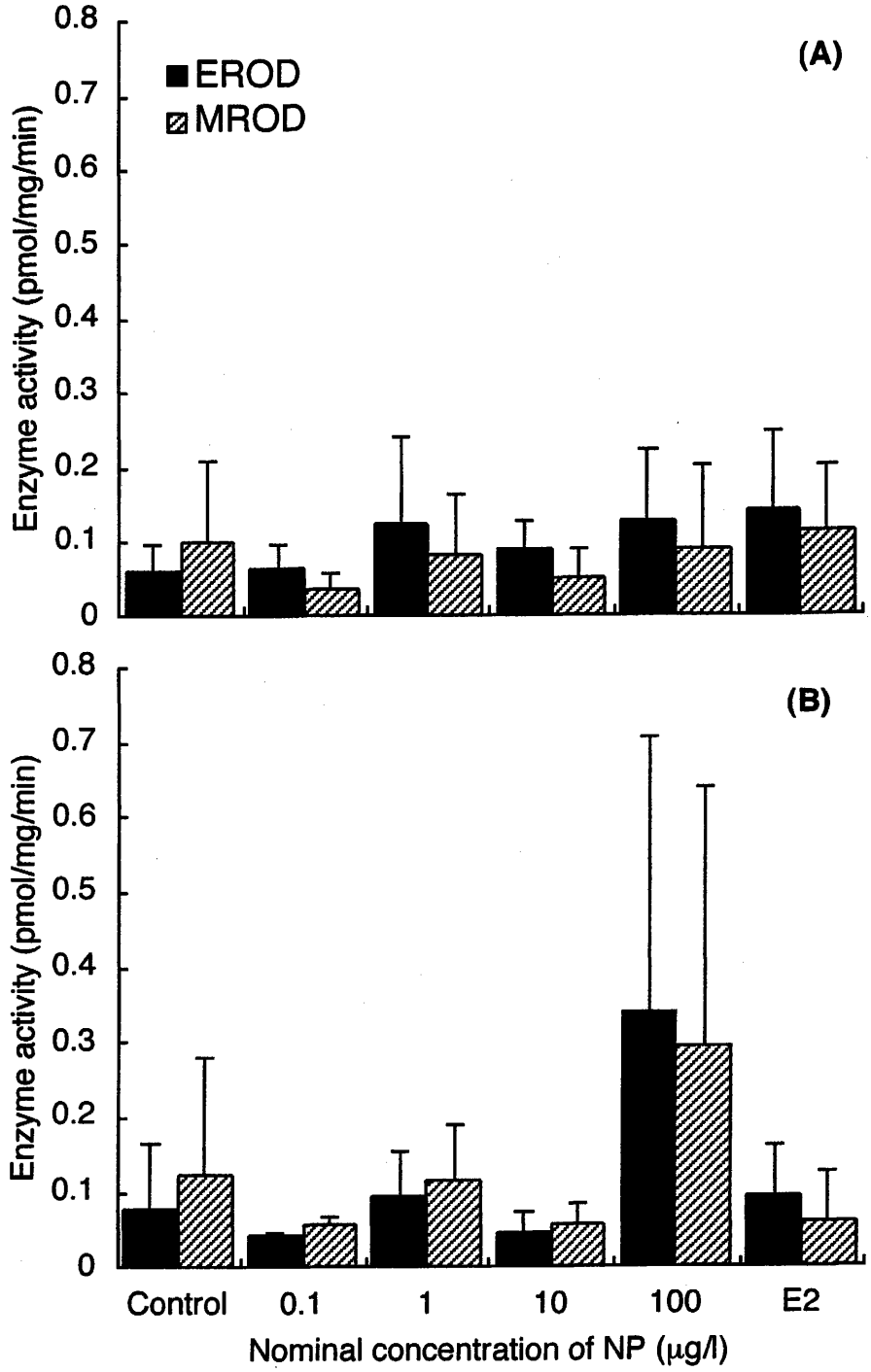

Fig. 8. Levels of hepatic EROD and MROD activities in the FD2- (A) or CD2- (B) fed group exposed to the nominal concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l of NP for 28 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation.

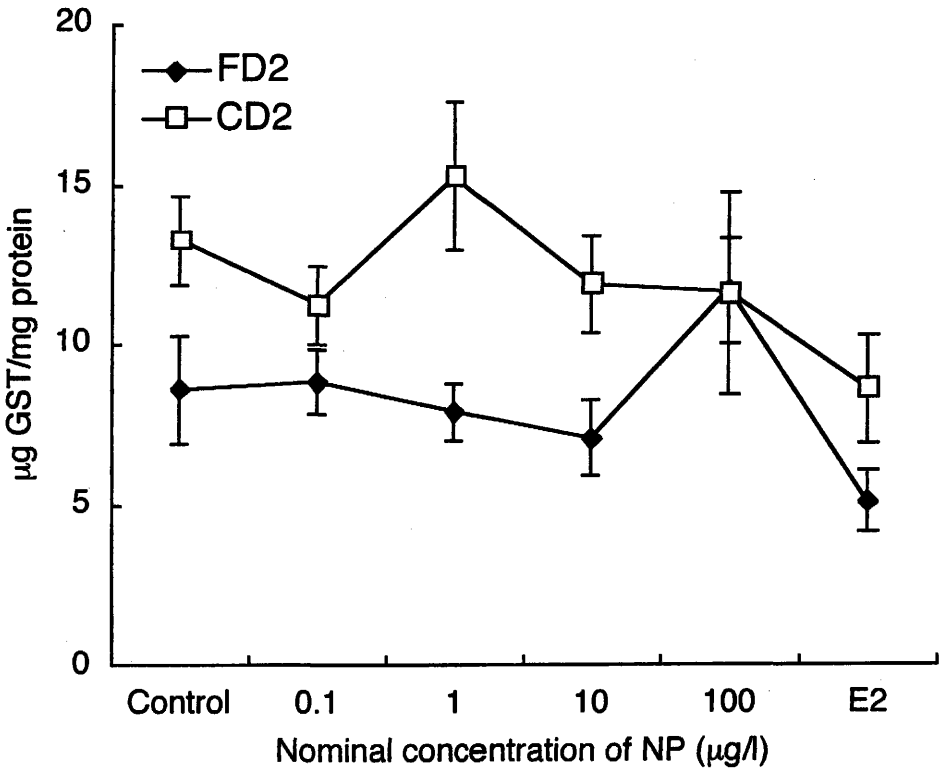

Fig. 9. Levels of hepatic GST activity in the FD2- (◆) or CD2-fed group (□) exposed to the nominal concentrations of 0.1, 1.0, 10 and 100 μg/l of NP for 28 days. Columns and bars represent the mean and standard deviation.

５．４　考察

近年、内分泌かく乱化学物質のスクリーニングに関する試験法の開発など国際的な取り組みがなされている。しかしながら、魚類のビテロゲニン産生を指標とした *in vivo* スクリーニング試験において、試験期間中の飼育に使用される市販飼料が魚類のビテロゲニン産生に与える影響は明らかでない。また、これら飼料中にはエストロゲン様作用を示す植物エストロゲンが含まれており、試験化学物質との相互作用も考えられる。第３，４章において、これらスクリーニング試験において、飼育飼料中の植物エストロゲン含有量と総エストロゲン活性を明らかにする必要性を示した。そこで本章では、飼料中に含まれる植物エストロゲンと NP の複合影響を明らかにすることを目的にした。

まず、FD2、TD2 及び CD2 中に含まれるゲニステイン、ダイゼイン、イクオール及びクメステロール含量を測定した。これら 3 種類の飼料における植物エストロゲン含量は CD2>TD2>FD2 の順に高い値を示した。次に、各種飼料中のβ-グルクロニダーゼによる酵素処理前後における hER-α及びβに対するエストロゲン活性を測定し、E2 換算値として算出した。β-グルクロニダーゼによる酵素処理後における TD2 及び CD2 の hER-βに対するエストロゲン活性は、hER-αに対する活性と比較して 10 倍程度高い活性を示し、第４章と同様の結果を得た。また、これら飼料のエストロゲン活性は CD2>TD2>FD2 の順に高い値を示した。さらに、FD2、TD2 及び CD2 を毎日体重あたり 1 %量与え 63 日間飼育した雄キンギョにおける血中ビテロゲニン濃度を経時的に測定した。CD2 給餌群の血中ビテロゲニン濃度は TD2 給餌群と比較して、給餌 14 及び 28 日後に有意に増加し、FD2 給餌群と比較して、給餌 7, 14, 28, 42 及び 63 日後に有意に増加した。

これら 3 種類の飼料を与えた雄キンギョの血中ビテロゲニン産生能は CD2>TD2>FD2 の順であった。以上のことから、FD2、TD2 及び CD2 中に含まれるエストロゲン様物質は、CD2>TD2>FD2 の順に高いことが強く示唆された。

これら 3 種類の飼料のうち、FD2 を植物エストロゲン低含有飼料、CD2 を植物エストロゲン高含有飼料とし、それらをそれぞれ与え NP に 28 日間曝露した雄キンギョ血中ビテロゲニン及び性ステロイドホルモン合成と肝臓中 CYP 1A 及び GST 活性に及ぼす影響を調べた。FD2 を与えた雄キンギョに初期設定濃度 0.1, 1, 10 及び 100 μg/l の NP を 28 日間曝露した。全ての NP 曝露群において HSI 及び GSI に有意差は認められず、対照群の GSI はこれまでの報告と同様のレベルであった [22]。一方、CD2 を与え各濃度の NP に曝露した雄キンギョにおいても HSI 及び GSI に有意差は認められなかった。これらのことから、100 μg/l 以下の NP は雄キンギョの HSI 及び GSI に影響しないことが示唆された。しかしながら、初期設定濃度 1 μg/l の E2 曝露群の GSI は対照群と比較して有意に減少した。Jobling ら [23]は、4 種類の異なるアルキルフェノール化合物をそれぞれ雄ニジマス *Oncorhynchus mykiss* に単独曝露し、血中ビテロゲニン産生と内因性エストロゲンの変化、さらには GSI の減少はそれらのエストロゲン様作用によって引き起こされたと報告している。これらのことから、E2 と CD2 中に含まれるエストロゲン様物質が複合しそれらのエストロゲン様作用により雄キンギョの精巣発達を抑制したことが示唆された。さらに、CD2 を与えた全ての NP 曝露群の GSI は、FD2 を与えた全ての NP 曝露群と比較して低い値を示す傾向にあった。これらの結果もまた、CD2 中のエストロゲン様物質、特に植物エストロゲンの作用により GSI の減少を誘起したと考えられた。

一般に、性ステロイドホルモンの血中濃度の情報はフィードバック機構によって脳で統御されており、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）と生殖腺刺激ホルモン（GTH） を介して最適濃度に調節されている。魚類において、精巣では、GTH の刺激によって 11-KT が合成され、それが精子形成を進行させる [24]。したがって、合成エストロゲンや植物エストロゲンなど外因性エストロゲン様物質の過剰投与は、生殖腺に直接作用するばかりではなく、視床下部-脳下垂体-生殖腺系の調節機構を混乱させ、卵母細胞の退縮や生殖器官の形成異常を引き起こすことが考えられる。そこで本研究では、植物エストロゲン低及び高含有飼料を与え NP に曝露した雄キンギョの性ステロイドホルモン量の変化について評価した。FD2 あるいは CD2 を与えた全ての NP 曝露群において、雄キンギョ血中 TS 及び 11-KT 濃度に対する濃度依存的な影響は認められなかった。しかしながら、CD2 を与えた全ての NP 曝露群の血中 TS 及び 11-KT 濃度は、曝露前と比較して有意に減少し、さらに FD2 を与えた全ての NP 曝露群と比較して低い値を示す傾向にあった。同様の観察がゲニステインを曝露したニジマスにおいて報告されている [25]。これらのことから、CD2 中に含まれるゲニステインやダイゼイン等の植物エストロゲンがエストロゲン様作用を示し、雄キンギョの血中 TS と 11-KT の合成を抑制し、結果として GSI の減少を引き起したことが示唆された。

一方、FD2 あるいは CD2 を与えた全ての NP 曝露群において、雄キンギョの血中 E2 濃度に対する濃度依存的な影響は認められなかった。Villeneuve ら [26]は、性成熟した雄コイ *Cyprinus carpio* を用い、4-ノニルフェノールの血中性ステロイドホルモン及びビテロゲニン量に及ぼす影響を検討し、それらは各曝露群間

において変化は認められなかったと報告している。しかしながら、Giesy ら[27]はファットヘッドミノー成魚 *Pimophales promelas* に 0.05-3.4 μg/l の NP を 42 日間曝露し、雄及び雌魚の血中 E2 濃度に顕著な影響を与えたと報告している。本研究において、100 μg/l 以下の NP は雄キンギョの血中 E2 合成に影響を与えず Villeneuve らと同様の結果を得た。NP が魚種の違いによりどのように血中エストロゲン合成に影響を及ぼすかは今回の結果からのみでは不明である。今後、曝露期間変化に伴うエストロゲン合成レベルをより詳細に調べる必要がある。これまで魚類を用い内分泌かく乱化学物質の影響評価を行った多くの報告は、測定技術や小型魚種での試料確保の困難さから性ステロイドホルモンの測定はあまり行われていない。本研究において、エストロゲン様物質低及び高含有飼料を与え NP に曝露した雄キンギョの性ステロイドホルモン量の変化について評価を試みた。これら性ステロイドホルモンの測定は、ビテロゲニン等の有用なバイオマーカーと併用することでより詳細に内分泌かく乱化学物質の影響評価を行えるものと考えられる。

FD2 を与えた 100 μg/l-NP 曝露群の血中ビテロゲニン濃度は、対照群と比較して曝露 7, 21 及び 28 日後において有意に増加した。Thorpe ら[28]と Tyler らは[29]、幼若雌ニジマスに 4-*t*-ノニルフェノール（4-*t*-NP）を曝露し、濃度依存的なビテロゲニンの増加が 14 日後に認められたとし、最小影響濃度（LOEC）は 16 μg/l であったと報告している。また Jobling らは[23]、2 年魚の雄ニジマス成魚に 4-*t*-NP を 21 日間曝露し、LOEC は 20.3 μg/l であったと報告している。これらのことより、100 μg/l の NP は雄キンギョの血中ビテロゲニンを産生しエストロゲン様作用を示すことが示唆された。しかしながら、これらの報告と比較して、雄

キンギョの血中ビテロゲニンが産生される NP 濃度は異なった。一般に魚類の曝露試験は、大きく分けて止水式試験（試験期間中、飼育水を交換しない）、半止水式試験（飼育水を一定時間ごとに半分または全量交換する）及び流水式試験（一定流量で一定濃度の化学物質を含む飼育水が一日数回程度入れ替わるように水槽に流し、オーバーフローした水は排出させる）の 3 つ方法がある。この中で、流水式試験は OECD の試験マニュアル[30]でも推奨しているように、最も望ましい試験方法だが、化学物質を用いた曝露試験では大量の廃水を処理する大規模な設備を必要とするため、小規模な研究機関では、止水式試験と半止水式試験が多用されている。本章の実験では、大型の排水処理設備が使用できないことや長期間の実験を考慮して半止水式試験による曝露試験を採用した。したがって、これまでの報告と比較して曝露方法が異なることも考慮し、今後、曝露期間中における経時的な化学物質の濃度変化を測定するとともに、10-100 μg/l の NP 濃度範囲における雄キンギョ血中ビテロゲニン産生に及ぼす影響を検討しなければならない。

環境省[31]は、大腸菌を用いて発現したメダカエストロゲン受容体（α）リガンド結合ドメインに対するノニルフェノール（混合物：NP）、4-*t*-オクチルフェノール（4-*t*-OP）、その他アルキルフェノール類の結合能を[^{3}H] E2との競争結合試験によって測定している。NP及び4-*t*-OPはいずれも濃度依存的にメダカエストロゲン受容体（α）と結合性を示し、その相対結合強度はそれぞれE2の約1/10、1/5で、ヒトエストロゲン受容体（α）に対する強度（いずれもE2の約1/2,000～1/3,000）と比較して強い結合性を示すことを示唆した。また、その他のアルキルフェノール類は、ヒトに比べると数百～数千倍の結合性がみられるものの、

最も結合性の強い4-*t*-ペンチルフェノールでも1/100、4-*t*-ブチルフェノールで1/500で、直鎖型のノーマル異性体ではいずれも数千分の1と弱い相対結合強度を示し、β受容体についても同様の試験を行った結果、E2と比較して、NPは約1/110とヒトに比べて約30倍の相対結合強度を示すことを示唆した。さらに、他魚種のα及びβ受容体についてNPの受容体結合試験を行った結果、マミチョグ（汽水域に棲息するアメリカ産メダカ科の魚種）α受容体（リガンド結合ドメイン）では約1/200の相対結合強度を示し、コイα受容体（リガンド結合ドメイン）では、約1/1,000であったとしている。以上のことから、生物種や魚種の違いにより、NPやその他のエストロゲン様物質は異なる感受性を示すことが強く示唆され、今後、様々な魚種を用いたスクリーニング試験によってNPを含めた内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用を評価し、また、各種エストロゲン受容体の生体内における機能についても検討する必要がある。

CD2 を与えた 100 μg/l-NP 曝露群の血中ビテロゲニン濃度は、対照群と比較して曝露 28 日後のみにおいて有意に増加した。また CD2 を与えた対照群の血中ビテロゲニン濃度は FD2 を与えた対照群と比較して 100 倍程度高濃度であった。Pelissero らは [32]、ゲニステイン、ダイゼイン、イクオール及びクメステロールのエストロゲン活性を、1 年魚のシベリアチョウザメ *Acipenser baeri* のビテロゲニン合成を指標として E2 と比較して評価しており、それら全ての物質は肝臓中ビテロゲニンの合成を引き起こすと報告している。これらのことから、CD2 中に含まれるゲニステインやダイゼインなどの植物エストロゲンがエストロゲン様作用を示し、雄キンギョの血中ビテロゲニン産生を誘導したことが示唆された。これまで、市販の飼育用飼料を摂取した場合のビテロゲニン合成に

及ぼす影響はほとんど評価されておらず、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験において様々な市販飼料が使用されている。これらは、試験前にすでにエストロゲン様物質に曝露されていることを示しており、飼料中に含まれる植物エストロゲンと試験物質はエストロゲン受容体に対し競合する可能性が考えられる。結果として、試験物質のエストロゲン様作用を検出不可能にするかもしれない。これらのことから、飼料中の植物エストロゲン測定及び低エストロゲン飼料の必要性が示唆された。

CD2 を与え 10 μg/l の NP を曝露した雄キンギョの血中ビテロゲニン濃度は、曝露 7, 21 及び 28 日後にかすかな減少傾向を示し、他の NP 曝露群は 7 日から 21 日後に増加傾向を示した。Panter ら [33]は抗エストロゲン様物質の ZM 189, 154 を未成熟ファットヘッドミノーに曝露した結果、ビテロゲニン産生の減少を引き起こし、エストロゲン受容体に対してアンタゴニストに作用したと報告している。また、メダカ *Oryzias latipes* では、肝臓中ビテロゲニン産生が抗エストロゲン物質として知られている 4 ヒドロキシタモキシフェンにより、濃度依存的に抑制され [34]、これらの手法を応用して、トリフェニルスズ及びトリブチルスズの抗エストロゲン様作用が明らかにされている [35]。これまで *in vivo* 試験において、NP の抗エストロゲン様作用は報告されていないが、今後、NP のエストロゲン・アンタゴニスト様作用についても評価する必要がある。

CD2 を与え 100 μg/l の NP に 28 日間曝露した雄キンギョにおける肝ミクロソーム中 EROD 及び MROD 活性は、統計学的に有意差は認められなかったものの対照群と比較して約 3 倍程度増加した。一方、FD2 を与え各濃度の NP に曝露した群においても同様に、統計学的に有意差は認められなかった。さらに、

肝ミクロソーム中 GST 活性についても同様に FD2 あるいは CD2 を与えた各群において統計学的な有意差は認められなかった。Arukwe ら [36]は 4-ノニルフェノールを未成熟大西洋サケ *Salmo Salar* の体重 1 kg あたり 1, 5, 25 及び 125 mg 投与し、肝ミクロソームにおける生体異物反応に及ぼす影響を検討し、4-ノニルフェノールは未成熟サケに対して用量依存的な肝ミクロソームの progesterone 6-, 16-, 及び 17-hydroxylase 活性の減少と EROD 及び UDP-glucuronosyltransferase 活性もまた減少すると報告している。これらのことから、100 μg/l 以下の NP は雄キンギョの肝 CYP 1A と GST 活性に顕著な影響を与えないことが示唆された。さらに、Arukwe らはこれまで魚類を用いた研究において、NP は肝 CYP 1A 活性を減少させ、CYP 3A タンパク及びその活性を増加させると報告している。一方、哺乳類の NP 代謝における CYP 1A と CYP 3A アイソフォームの役割は、これまで Lee らによって報告され、ラット肝臓中において NP は CYP 1A 活性を抑制し、CYP 3A 活性を誘導するとしている [37,38]。それゆえに、これらの酵素は、NP の第一相代謝反応に重要な役割を果たしているかもしれず、今後、NP と他の CYP アイソフォームとの相互作用や、様々な曝露濃度の NP における CYP 1A, CYA 3A 及び GST 活性の誘導あるいは抑制に及ぼす影響を検討しなければならない。

以上のことより、血中ビテロゲニン合成を指標とした内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用評価系において、初期設定濃度 100 μg/l の NP は、雄キンギョに対してエストロゲン様作用を示し、低植物エストロゲン含有飼料 FD2 を与えた雄キンギョは、血中ビテロゲニン濃度を低値に保ち、エストロゲン様物質に対して高感受性を示すことが示唆された。今後、内分泌かく乱化学物質

のスクリーニング試験において、試験化学物質以外の要因（例えば、飼料中の植物エストロゲンなど）による血中ビテロゲニン産生、各種性ステロイドホルモンの合成や抑制、さらには薬物代謝酵素活性レベルに憂慮し、それらバイオマーカーに影響を与える可能性が低い魚類飼育用飼料の開発及び標準化が必要である。

5．5　参考文献

1) T. Colborn, F.S. vom Saal, A.M. Soto: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 101, 378-384 (1993).

2) T. Colborn, D. Dumanoshi, J.P. Myers: Our Stolen Future. Dutton, NY, USA (1996).

3) S. Jobling, M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty, J.P. Sumpter: Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 19, 2812-2820 (1998).

4) Organization for Economic Cooperation and Development: Final report of the fish expert consultation meeting, London, UK, October, 28-29. Environmental Health and Safety Division, Paris, France (1999).

5) U.S. Environmental Protection Agency: Endocrine Disruptor Screening Program: Proposed Statement of Policy. *Fed. Reg.*, Vol. 248, 71542-71568 (1998).

6) J.P. Sumpter, S. Jobling: Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, Vol. 103, 173-178 (1995).

7) S.S. Talmage: Environmental and human safety of major surfactants. Alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxylates. The Soap and Detergent Association (1994).

8) H. Yokota, M. Seki, M. Maeda, Y. Oshima, H. Tadokoro, T. Honjo, K. Kobayashi: Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 20, 2552-2560 (2001).

9) A.G. Michelle, D.M. Chris: Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 16, 1082-1086 (1997).

10) N.R. Adams, M.R. Sanders: Persistent infertility in ewes after prolonged exposure to oestradiol-17b. *J. Reprod. Fertil.,* Vol. 84, 373-378 (1988).

11) J.M. Obst, R.F. Seamark: Plasma hormone levels during pregnancy and parturition in ewes grazing Yarloop clover patures. *J. Reprod. Fertil.,* Vol. 29, 146-147 (1972).

12) D.A. Shutt, R.I. Cox: Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors *in vitro*. *J. Endocrinol.,* Vol. 52, 299-310 (1972).

13) M.A. Thompson, B.L. Lasley, B.A. Rideout, L.H. Kasman: Characterization of the estrogenic properties of a nonsteroidal estrogen, equol, extracted from urine of pregnant macaques. *Biol. Reprod.,* Vol. 31, 705-713 (1984).

14) H. Adlercreutz, K. Hockerstedt, C. Bannwart, S. Bloigu, E. Hamalainen, T. Fotsis, A. Ollus: Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). *J. Steroid Biochem.,* Vol. 27, 1135-1144 (1987).

15) M. Kobayashi, H. Ishibashi, T. Moriwaki, T. Koshiishi, S. Ogawa, T. Matsumoto, K. Arizono, S. Watabe: Development of low estrogen fish diet for *in vivo* endocrine disrupter test. in preparation (2002).

16) K. Arizono, T. Ito, M. Yamaguchi, T. Ariyoshi: Induction of zinc metallothionein in the liver of rats by lead. *Eisei Kagaku,* Vol. 28, 94-98 (1982).

17) T. Ariyoshi, E. Takabatake, H. Remmer: Drug metabolism in ethanol induced fatty liver. *Life sci.,* Vol. 9, 361-369 (1970).

18) O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* Vol. 193, 265-275 (1951).

19) S. Yamanaka, K. Arizono, Y. Matsuda, K. Soyano, H. Urushitani, T. Iguchi, R. Sakakibara: Development and application of an effective detection method for fish plasma vitellogenin induced by environmental estrogens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* Vol. 62, 1196-1200 (1998).

20) M.M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.,* Vol. 72, 248-254 (1976).

21) K. Asahina, A. Kambegawa, T. Higashi: Development of a microtiter plate enzyme-linked immunosorbent assay for 17α, 20β-21-trihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost gonadal steroid. *Fisheries Science,* Vol. 61, 491-494 (1995).

22) M. Kobayashi, K. Aida, I. Hanyu: Annual changes in plasma levels of gonadotropin and steroid hormones in goldfish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,* Vol. 52, 1153-1158 (1986).

23) S. Jobling, D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, J.P. Sumpter: Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.,* Vol. 15, 194-202 (1996).

24) 日本比較内分泌学会編: ホルモンの分子生物学 3—生殖とホルモン—, 学会出版センター (1998).

25) C. Bennetau-Pelissero, B.B. Breton, B. Bennetau, G. Corraze, F. Le Menn, B. Davail-Cuisset, C. Helou, S.J. Kaushik: Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss. Gen. Comp. Endocrinol.*, Vol. 121, 173-187 (2001).

26) D.L. Villeneuve, S.A. Villalobos, T.L. Keith, E.M. Snyder, S.D. Fitzgerald, J.P. Giesy: Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere,* Vol. 47, 15-28 (2002).

27) J.P. Giesy, S.L. Pierens, E.M. Snyder, S. Miles-Richardson, V.J. Kramer, S.A. Snyder, K.M. Nichols, D.A. Villeneuve: Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.,* Vol. 19, 1368-1377 (2000).

28) K.L. Thorpe, T.H. Hutchinson, M.J. Hetheridge, J.P. Sumpter, C.R. Tyler: Development of an *in vivo* screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.,* Vol. 19, 2812-2820 (2000).

29) C.R. Tyler, R. Aerle, M.V. Nilsen, R. Blackwell, S. Maddix, B.M. Nilsen, K. Berg, T.M. Hutchinson, A. GoksØyr: Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to quantify vitellogenin for studies on environmental estrogens in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Chem.,* Vol. 21, 47–54 (2002).

30) OECD. Fish, acute toxicity test. Organization for Economic Cooperation and Development Guide line for testing and chemicals. Method 203. OECD, Paris.

31) 環境省: ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告 (2001).

32) C. Pelissero, B. Bennetau, P. Babin, F. Le Menn, J. Dunogues: The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 38, 293-299 (1991).

33) G.H. Panter, T.H. Hutchinson, H. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla, C.R. Tyler: Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-) estrogenic substances. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 21, 319-326 (2002).

34) 鑪迫典久, 小塩正朗, 早川洋一, 河辺聖, 近藤卓哉, 白石不二雄, 森田昌敏: メダカを用いた *in vivo* 系エストロゲンアンタゴニスト活性測定法の開発. 日本内分泌撹乱化学物質学会第四回研究発表会要旨集, 115 (2001)

35) 小塩正朗, 鑪迫典久, 河辺聖, 難波亜由美, 森田昌敏: メダカを用いた *in vivo* 系エストロゲンアンタゴニスト活性測定法による TPT, TBT の評価. 第八回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会, 51 (2002).

36) A. Arukwe, F. Lars, G. Anders: Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo Salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, Vol. 16, 2576-2583 (1997).

37) P.C. Lee, S.C. Patra, C.T. Stelloh, W. Lee, M. Struve: Interaction of nonylphenol and hepatic CYP 1A in rats. *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 52, 885-889 (1996).

38) P.C. Lee, S.C. Patra, M. Struve: Modulation of rat hepatic CYP 3A by nonylphenol. *Xenobiotica*, Vol. 26, 831-838 (1996).